کیت استخراج RNA ویروسی از خون و مایعات بدن

شماره کاتالوگ (BP-171)

این کیت برای برای استخراج RNAویروسی از خون و مایعات بدن می باشد که برای انجام ۵۰ تست آماده شده است. در این کیت ابتدا RNA ویروسی از پلاسمای حاوی ضد انعقاد نظیر EDTA ، سرم و سایر مایعات بدن که فاقد توده سلولی است هستند جدا سازی می شود. این کیت برای استخراج RNA از سرم و پلاسما و سایر مایعات بدن می باشد. در این سیستم ابتدا نمونه سرم و پلاسما و سایر مایعات بدن در حضور ترکیبات لیز کننده نظیر فنل و پروتئیناز Kقرار می گیرد. سپس RNA آزاد شده ویروس در حضور Carrier RNA و گوانیدین HCL و ایزوتیوسیانات RNA ویروسی و سپس و با اضافه شدن اتانول ۹۶% و طی چند مرحله شستشو سایر مواد و ناخالصی ها شسته شده و فقط RNA ویروسی به ستون جاذب Spin column اتصال می یابد. در نهایت با اضافه شدن بافر الوشن و شرایط PH بازی RNA ویروسی مورد نظر از ستون شسته شده و برای استفاده های بعدی در فریزر 20- نگهداری می شود.

محتویات کیت:

Components	مقدار
BP Lysis Buffer	1× 24ml
BP Binding solution	1×24 ml
BP washing Buffer 1	1× 30ml
BP washing Buffer 2	1× 30ml
BP Elution Buffer	1× 3ml
Spin column	50 عدد

پروتکل انجام آزمایش:

تجهیزات لازم:

۲- سانتریفیوژ

۳- سمپلر ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ لاندا

روش کار:

۱- ابتدا مقدار 200µL از نمونه پلاسماي بيمار در يک ميکروتيوب تميز و استريل بريزيد به آن اضافه کنيد و سپس به آن 200µL از ويال BP Lysis Buffer اضافه کنيد و سپس مخلوط کنيد و براي مدت ۱۰ دقيقه در دماي اتاق قرار داده دهيد .

۲- سپس 200µL از ويال BP Binding Solution به آن اضافه نموده و همچنين 200µL اتانل ۹۶ درصد به آن اضافه کرده و براي مدت ۲۰ ثانيه با دور آهسته ورتکس و سپس اسپين کنيد.

۳- مخلوط حاصله را به Spin column انتقال دهيد احتياط نمايد در حين انتقال نبايد درب آن مرطوب گردد سپس دور 8000 RPM بمدت ۱ دقيقه سانتريفيوژکنيد.

۴- مايع زير ستون را دور بريزيد و سپس 500µL از ويال BP washing Buffer 1 به ان اضافه گرديد و سپس در دور 8000 RPM به مدت ۱ دقيقه سانتريفيوژکنيد.

۵- مايع زير ستون را دور بريزيد و سپس 500µL از ويال BP washing Buffer 2 به ان اضافه گرديد و سپس در دور 14000 RPM به مدت 3 دقيقه سانتريفيوژکنيد.

۶- مايع زير ستون را دور بريزيد و سپس در دور 14000 RPM به مدت 1 دقيقه سانتريفيوژکنيد.

۷- ستون Spin column را به يك ميکروتيوب 1.5 ميلي ليتري فاقد RNA & DNA free منتقل گرديد وبه آن 50µL از ويال BP Elution Buffer اضافه کنيد و به مدت ۵ دقيقه در دماي اتاق قرار داده شد و سپس در دور 8000 RPM به مدت 1 دقيقه سانتريفيوژکنيد.

۸- ستون Spin column دور انداخته شد و RNA استخراج شده در ته لوله جمع شده بايد فورا به cDNA تبديل شود و يا براي استفاده بعدي در فريزر منهاي ۷۰ نگهداري کنيد.

BP RNA Extraction Kit

مواد مورد نیاز:

۱- گوانیدین هیدروکلراید

۲- توئین ۲۰

۳- تریتون X100

۴- NaOH

۵- پروتئیناز K

۶- ستون های سیلیکا خریداری شده از آلمان

۷- تریس هیدروکلراید

۸- سدیم آزاید

۹- ایزوپروپانول

۱۰- EDTA

۱۱- پروتئیناز K

۱۲- آب Rnase Dnase Free

۱۳- Spin column

پروسه:

این کیت از ۵ سری محلول تشکیل شده است.

- BP Lysis Buffer

این بافر حاوی ترکیباتی نظیر مقادیر مناسبی از توئین ۲۰، تریتون X-100 ، تریس HCL و محلولEDTA با غلظت مناسب مخلوط کرده و با کمک NaOH پی اچ آن را برروی ۸ تنظیم می کنیم و به کمک آب دوبار تقطیر حجم آن را به یک لیتر می رسانیم. این محلول را به میزان ۴۰ میلی لیتر در ویال های استریل جهت تهیه کیت می ریزیم.

- BP Binding Solution

این محلول حاوی ترکیباتی نظیر مقادیر مناسبی از گوانیدین تیوسیانات و تریس هیدروکلراید با مولاریته مناسب می باشد.

- BP washing Buffer 1

این بافر در مرحله اول شستشوی ستون استخراج RNA استفاده می شود و حاوی مقدار مناسبی از تریس هیدروکلراید و ایزوپروپانول است که بصورت کنستانتره ۹۶% ساخته می شود.

- BP washing Buffer 2

این بافر در مرحله دوم شستشوی ستون استخراج RNA استفاده می شود و حاوی مقدار مناسبی از تریس هیدروکلراید و ایزوپروپانول است است که بصورت کنستانتره ۶۵% ساخته می شود.

- BP Elution Buffer

این بافر حاوی ترکیبات مقدار مناسبی از محلول EDTA با مولاریته مشخص بوده که با مقدار مناسبی از سدیم آزاید ترکیب شده و به کمک سود مقدار پی اچ آن بر روی ۸.۵ تنظیم می شود.

Spin column

این ستون جاذب بصورت آماده خریداری می گردد و در کیت قرار می گیرد

آزمون های اعتبار سنجی:

بعد از تولید این کیت آزمون های اعتبار سنجی با کمک نمونه های استاندارد NIBSC WHO از ویروس حاوی RNA نظیر HCV اعتبار سنجی می شود و کمترین میزان تیتری از این ویروس که توسط کیت قابل تشخیص است مورد ارزیابی قرار می گیرد.

توصیف:

در این کیت ابتدا RNA ویروسی از پلاسمای حاوی ضد انعقاد نظیر EDTA ، سرم و سایر مایعات بدن که فاقد توده سلولی است هستند جدا سازی می شود.

این کیت برای استخراج RNA از سرم و پلاسما و سایر مایعات بدن می باشد. در این سیستم ابتدا نمونه سرم و پلاسما و سایر مایعات بدن در حضور ترکیبات لیز کننده نظیر فنل و پروتئیناز Kقرار می گیرد. سپس RNA آزاد شده ویروس در حضور Carrier RNA و گوانیدین HCL و ایزوتیوسیانات RNA ویروسی و سپس و با اضافه شدن اتانول ۹۶% و طی چند مرحله شستشو سایر مواد و ناخالصی ها شسته شده و فقط RNA ویروسی به ستون ستون جاذب Spin column اتصال می یابد. در نهایت با اضافه شدن بافر الوشن و شرایط PH بازی RNA ویروسی مورد نظر از ستون شسته شده و برای استفاده های بعدی در فریزر 20- نگهداری می شود.